

Aus dem Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. R. Bachmann

Methoden zur Richtungsbestimmung linearer Strukturen in der Histologie

3. Mitteilung: Entwicklung einer photometrischen Methode
aufgrund des Azimuteffektes

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Manfred Pfoch

aus

Essen

1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Rudolf Wetzstein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Werner Bickenbach
Dekan:	Prof. Dr. Manfred Kiese
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Februar 1968



Sonderdruck aus
Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik
Band 69, Heft 3 (1969)
S. Hirzel Verlag, Stuttgart

(Aus dem Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität München.
[Direktor: Prof. Dr. med. R. BACHMANN])

Methoden zur Richtungsbestimmung linearer Strukturen in der Histologie

3. Mitteilung: Entwicklung einer photometrischen Methode aufgrund des Azimuteffektes

Von **M. Pfoch**

(Aus dem Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität München.
[Direktor: Prof. Dr. med. R. BACHMANN])

Methoden zur Richtungsbestimmung linearer Strukturen in der Histologie

3. Mitteilung: Entwicklung einer photometrischen Methode aufgrund des Azimuteffektes

Von M. Pfoch

Mit 10 Abbildungen

Einleitung

In der vorausgehenden Mitteilung wurde beschrieben, wie an besonders vorbereiteten Schnittpräparaten bei Beleuchtung im einseitigen Dunkelfeld lineare Strukturen bestimmter Verlaufsrichtung eindrucksvoll herausgehoben werden: senkrecht (bzw. annähernd senkrecht) zum Lichteinfall verlaufende Strukturen leuchten hell auf, alle übrigen bleiben dunkel (Azimuteffekt). Das Verlangen nach objektiven Verfahren für die Bestimmung der Richtungsverteilung von linearen Strukturen im histologischen Präparat brachte uns auf den Gedanken, über die photometrische Messung dieses Leuchteffektes zu einer quantitativen Methode zu gelangen, die den Verfahren der unmittelbaren Winkelmessung (1. Mitt.) überlegen sein könnte. Es müßte für die verschiedenen Beleuchtungsazimute möglich sein, aus der Gesamthelligkeit im Gesichtsfeld auf die Menge derjenigen Strukturen zu schließen, die senkrecht zur jeweiligen Einfallrichtung des Lichtes verlaufen.

In Vorversuchen haben wir Myometriumschnitte, die wir mit Methoden der unmittelbaren Winkelmessung bereits ausgewertet hatten, unter Azimuten beleuchtet, die den Winkelklassen jener Messungen entsprachen; als (reziprokes) Maß der Helligkeit im Gesichtsfeld registrierten wir die von der Belichtungsautomatik des Zeiss-Photomikroskops geschaltete Expositionszeit. Schon bei dieser improvisierten Anordnung erhielten wir reproduzierbare, den Ergebnissen der unmittelbaren Winkelmessung analoge Resultate: prinzipiell schien der eingeschlagene Weg gangbar zu sein. Allerdings stellten wir bald fest, daß verschiedene Parameter die Resultate beeinflussen, so Eigenschaften des Objektivs, Besonderheiten der Beleuchtungsanordnung (Lichtbündelung, Einfallswinkel) und des Präparates (Verhältnis der Brechungsindices von Struktur und Einschlußmedium).

Die Absicht, aus der Anordnung ein praktisch anwendbares, gesichertes Meßverfahren zu entwickeln, erfordert eine eingehende (über das in der 2. Mitt. Gesagte hinausgehende) Analyse des Azimuteffektes, aus der die Funktion der erwähnten Parameter abgeleitet werden kann und verlangt darüber hinaus Versuche an geeigneten Modellpräparaten.

A. Analyse des Azimuteffektes

1. Der Strahlengang im einseitigen Dunkelfeld. Im einseitigen Dunkelfeld ist die Beleuchtungsrichtung durch zwei Winkelangaben festgelegt (Abb. 1):

Der Einfallswinkel α_k ist der Winkel zwischen dem Zentralstrahl des beleuchtenden Bündels und der optischen Achse des Mikroskops.

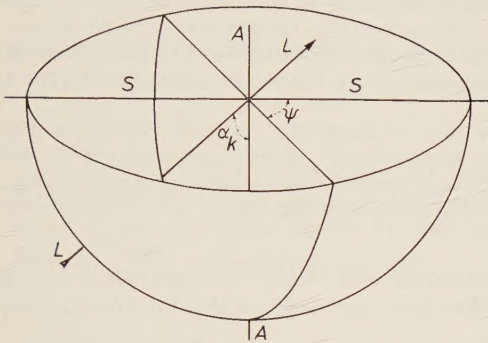


Abb. 1. Einfallswinkel α_k und Azimut ψ bei einseitiger Dunkelfeldbeleuchtung (der Lichtstrahl L kommt von links hinten). — A Achse des Mikroskops, S lineare Struktur.

Das Azimut ψ ist der Winkel zwischen der Projektion des Zentralstrahls in die Objekttisebene und einer in dieser Ebene festgelegten Bezugsachse (z. B. einer linearen Struktur).

Der Strahlengang beim Azimuteffekt wird erstmalig von SIEDENTOPF (1912) am Beispiel submikroskopischer linearer Strukturen analysiert. Von diesen breiten sich bei schräger Beleuchtung mit parallelem Licht kegelförmig Beugungselementarwellen aus (Abb. 2 a); die Struktur liegt in der Achse eines so entstandenen „Beugungskegels“, dessen Spitzenwinkel σ doppelt so groß ist wie das Beleuchtungsazimut:

$$\sigma = 2\psi \quad (1)$$

Bei senkrechter Beleuchtung ($\psi = 90^\circ$) breitet sich von der Struktur alles Licht in radiären Richtungen ($\sigma = 180^\circ$) aus (Abb. 2 b).

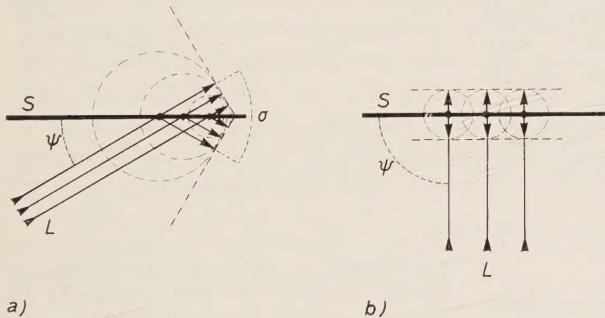


Abb. 2. Beugung an einer submikroskopischen linearen Struktur (S); abgeändert nach SIEDENTOPF. L Lichtstrahlen, ψ Beleuchtungsazimut, σ Spitzenwinkel des Beugungskegels. — a) Kegelförmige Lichtausbreitung bei schrägem Beleuchtungsazimut. b) Radiäre Lichtausbreitung bei senkrechtem Beleuchtungsazimut.

Der Frage, ob bei Reflexion und Brechung des Lichtes an größeren linearen Objekten analoge Lichtkegel entstehen, gingen wir mit zwei einfachen Versuchen nach:

1. Senkrecht zu einer Projektionsfläche wird ein zylindrischer, gut reflektierender Metallstab angebracht und mit einem schmalen Lichtbündel unter spitzem Winkel beleuchtet. — Wo das Lichtbündel auf die Projektionsfläche trifft, sieht man erwartungsgemäß einen Lichtfleck mit dem Schatten des Stabes. Er liegt auf dem Umfang eines gleichmäßig hellen, scharf begrenzten Lichtringes, dessen Zentrum mit der Stelle übereinstimmt, an der der Stab die Fläche berührt. Beleuchtet man den Stab unter größerem Winkel oder verschiebt man (bei unverändertem Winkel) das Lichtbündel

so, daß es den Stab in einer von der Projektionsfläche weiter entfernten Stelle trifft, so entsteht ein größerer Lichttring.

2. Führt man diesen Versuch mit einem Glasstab aus, so erhält man ein prinzipiell übereinstimmendes Ergebnis. Allerdings ist der Lichttring in diesem Fall weniger scharf begrenzt und in verschiedenen Abschnitten unterschiedlich hell, was sich aus der Überlagerung von reflektiertem und gebrochenem Licht erklärt.

Die in beiden Versuchen beobachteten Lichtringe sind basisparallele Schnitte durch Lichtkegel, deren Achse der Metall- bzw. der Glasstab ist und deren Spitze jeweils dort liegt, wo der Stab vom Lichtbündel getroffen wird. Diese durch Reflexion (1) bzw. durch Reflexion + Brechung (2) entstandenen Lichtkegel entsprechen vollkommen den Beugungskegeln nach SIEDENTOPF. — Auf dem Azimuteffekt beruhende Beobachtungs- und Meßverfahren sind daher nicht auf submikroskopische Dimensionen beschränkt, sondern können zur Untersuchung linearer Strukturen jeder Größenordnung angewendet werden.

Da in beiden Versuchen weder ein Polarisator noch ein Analysator verwendet wurde, scheiden polarisationsoptische Phänomene als Ursache des Azimuteffektes aus. Dies gilt auch für die Beobachtung am Mikroskop: der Azimuteffekt tritt hier mit gleichbleibender Intensität und Richtungsabhängigkeit auf, unabhängig davon, ob in den Strahlengang zwischen Objekt und Photometer ein Analysator eingefügt wird oder nicht.

Die einfache Beziehung zwischen Spitzenwinkel und Beleuchtungsazimut $\sigma = 2\psi$ gilt nur, wenn das Azimut in derselben Ebene gemessen wird, in der lineare Struktur und parallele Lichtstrahlen verlaufen; am Mikroskop würde dies dem Sonderfall einer Beleuchtung unter senkrechtem Einfallswinkel gegen die optische Achse ($\alpha_k = 90^\circ$) entsprechen. Für den allgemeinen Fall der schrägen Dunkelfeldbeleuchtung (mit parallelem Licht) muß jedoch außer dem Beleuchtungsazimut ψ auch der Einfallswinkel α_k berücksichtigt werden, den das Licht mit der optischen Achse des Mikroskops einschließt. — In einem dreidimensionalen Gesamtschema („Einheitskugel“ nach SIEDENTOPF, Abb. 3) schneiden sich die optische Mikroskopachse, eine lineare Struktur und ein Lichtstrahl in einem Punkt (Kugelmittelpunkt). Aus dem Kugeldreieck kann die Beziehung

$$\cos \sigma/2 = \cos \psi \cdot \sin \alpha_k \quad (2)$$

abgeleitet werden.

Ein Objektiv mit der numerischen Apertur (n. A.) $\sin \alpha_0$ erhält von der in der Tisebene liegenden linearen Struktur nur dann Licht, wenn der halbe Spitzenwinkel $\sigma/2 > (90 - \alpha_0)$ ist; bei $\sigma/2 < (90 - \alpha_0)$ ist die Struktur unsichtbar. Besonderes Interesse kommt dem (in Abb. 3 wiedergegebenen) Grenzfall zu, bei dem

$$\sigma/2 = 90 - \alpha_0 \quad (3)$$

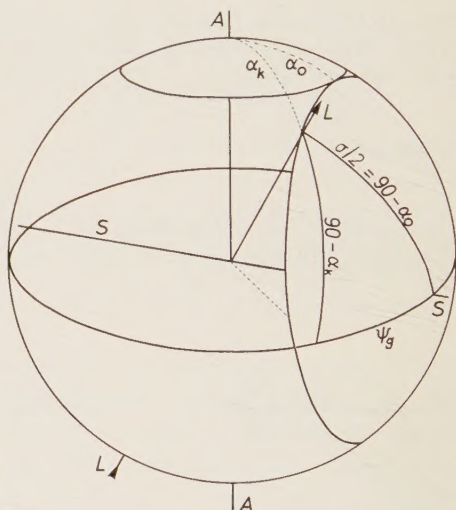


Abb. 3. „Einheitskugel“; abgeändert nach SIEDENTOPF. — Achse des Mikroskops (A), lineare Struktur (S) und Lichtstrahl (L) schneiden sich im Kugelmittelpunkt. α_k Einfallswinkel, ψ_g Grenzazimut, σ Spitzenwinkel des Lichtkegels, α_0 Öffnungswinkel eines Objektivs. Aus dem Kugeldreieck ergibt sich die Funktion: $\sin \alpha_0 = \cos \psi_g \cdot \sin \alpha_k$ (vgl. Text).

ist. In diesem Fall tritt das sehr gut zu beobachtende *Auslöschphänomen* auf, bei dem gerade kein Licht mehr ins Objektiv eindringen kann; die Nadel ist unsichtbar. Bei geringfügiger Vergrößerung des Spitzenwinkels — z. B. durch Vergrößerung des Beleuchtungsazimutes — leuchtet sie im dunklen Gesichtsfeld wieder hell auf. Das Beleuchtungsazimut, bei dem $\sigma/2 = 90 - \alpha_0$ ist, wird *Grenzazimut* ψ_g genannt; für dieses Azimut ergibt sich durch Einsetzen von (3) in (2):

$$\sin \alpha_0 = \cos \psi_g \cdot \sin \alpha_k \quad (4)$$

(SIEDENTOPF hat diese Beziehung abgeleitet, um bei bekanntem Einfallswinkel durch einfache Messung von ψ_g die unbekannte numerische Apertur eines Objektivs zu bestimmen.)

2. Bedeutung des Helligkeitsbereiches und Definition der Trennschärfe. Zwischen beiden Grenzazimuten (ψ_{g1} und ψ_{g2}) liegt der Helligkeitsbereich $\Delta\psi$. Da er sich von $\psi = 90^\circ$ nach beiden Seiten gleich weit erstreckt ($90 - \psi_{g1} = 90 - \psi_{g2}$), gilt

$$\Delta\psi = 2(90 - \psi_g) \quad (5)$$

setzt man dies in Gl. (4) ein, so folgt

$$\sin \frac{\Delta\psi}{2} = \frac{\sin \alpha_0}{\sin \alpha_k} \quad (6)$$

Kreuzen sich in der Objektisebene zwei Strukturen unter dem Winkel $\Delta\psi$, so sind beide völlig dunkel, wenn das Beleuchtungsazimut senkrecht auf ihrer Winkelhalbierenden steht; wird das Azimut nur geringfügig verändert, so leuchtet eine der beiden Strukturen auf. — Registriert man mit einer photometrischen Meßanordnung die Helligkeitsschwankungen im Gesichtsfeld bei veränderlichem Beleuchtungsazimut, so kann man für diesen Schnittwinkel gerade noch zwei vollständig voneinander getrennte Helligkeitsmaxima erwarten; für Schnittwinkel, die kleiner sind als $\Delta\psi$ gehen die Maxima in einer mehr oder weniger flachen Einsenkung ineinander über (vgl. S. 136, Abb. 7 a – c).

Die Trennschärfe einer photometrischen Meßanordnung (Winkelauflösung) ist also um so größer, je kleiner der Helligkeitsbereich schräg beleuchteter linearer Strukturen ist. Definieren wir sinngemäß die *Trennschärfe* durch

$$t = \cos \Delta\psi \quad (7)$$

so folgt in (7) durch Einsetzen von (6)

$$t = 1 - 2 \frac{\sin^2 \alpha_0}{\sin^2 \alpha_k} \quad (8)$$

Die maximale Trennschärfe beträgt theoretisch $t = 1$ (bei $\sin \alpha_0 = 0$); eine weitgehende Annäherung an dieses Maximum ist tatsächlich möglich, wenn durch ein Objektiv mit sehr kleiner numerischer Apertur beobachtet und unter möglichst großem Einfallswinkel beleuchtet wird (vgl. S. 134). Objektive, deren n. A. $\geq 0,5 \sqrt{2}$ also größer als ca. 0,7 ist, sind für photometrische Win-

kelmessungen ungeeignet, da selbst bei $\alpha_k = 90^\circ$ eine Trennschärfe von $t \leq 0$ resultiert.

Bisher wurde eine Beleuchtung mit parallelem Licht vorausgesetzt. Diese Forderung kann jedoch nicht immer exakt erfüllt werden; bei der Beleuchtung mit gebündeltem Licht muß der Konvergenzwinkel ε zum Helligkeitsbereich addiert werden. Die Trennschärfe ist dann

$$t = \cos(\Delta\psi + \varepsilon). \quad (9)$$

B. Modellversuche an Glasfäden

Ziel der Modellversuche ist: 1. Die experimentelle Bestätigung der abgeleiteten Beziehung zwischen Objektivapertur, Beleuchtungsazimut und Trennschärfe, 2. die Untersuchung, welche Bedeutung den Brechungsverhältnissen innerhalb des Präparates zukommt, 3. die Ausführung von photometrischen Winkelmessungen an definierten Modellpräparaten unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen.

Material und Methoden

Modelle. Als Modelle für lineare Bauelemente mikroskopischer Größenordnung verwenden wir Glasfäden mit einem Durchmesser von $10-12 \mu\text{m}$ und dem Brechungsindex $n \sim 1,54$. Die Fäden werden in definierter Zahl und Richtungsverteilung angeordnet und in Einschlußmittel mit bekanntem Brechungsindex eingeschlossen.

Meßanordnung. Sämtliche Versuche werden am Zeiss-Photomikroskop nach Entfernen des Kondensors ausgeführt. Die photometrische Messung der Lichtintensität im Gesichtsfeld erfolgt mit einer dem Tubuskopf aufgesetzten Selenzelle, deren Photostrom von einem Galvanometer mit regelbarem Meßbereich zwischen $0,001$ und $100 \mu\text{A}$ angezeigt wird.

Beleuchtung. I. Anordnung mit parallelem Licht. Mit üblicher Laboratoriumseinrichtung kann nur annähernd paralleles Licht erzeugt werden, wobei ein beträchtlicher Intensitätsverlust in Kauf genommen werden muß. In einem Kleinbildprojektor „Prado 500“ (Leitz) wird die vor der Lichtquelle angebrachte Sammellinse so verschoben, daß das Licht in einem möglichst stark konvergierenden Bündel auf eine Lochblende ($\phi 1,8 \text{ mm}$) in der Diapositivebene fokussiert wird. Von dieser Blende wird mit dem Projektiv aus möglichst großer Entfernung ($> 5 \text{ m}$) ein scharfes Bild auf einen unter dem Objektisch beweglich angebrachten Planspiegel geworfen. Die Strahlen dieses Bündels dürfen für unseren praktischen Zweck als ausreichend parallel aufgefaßt werden. Durch Änderung der Spiegelstellung kann der Einfallswinkel des Lichtes (gegen die Mikroskopachse) verändert werden. Da diese Beleuchtungsanordnung starr ist, wird das Azimut durch Drehen des Präparates mit einem exakt zentrierbaren (Polarisations)-Drehtisch verändert; dieser trägt eine Gradeinteilung, die eine Ablesegenauigkeit bis $0,2^\circ$ erlaubt.

II. Anordnung mit gebündeltem Licht. Eine größere Lichtintensität erzielt man mit dem gebündelten Licht einer drehbaren Beleuchtungsanordnung: Wir entnehmen dem Zeiss-Stereomikroskop die Bodenplatte mit dem drehbaren Objektisch und befestigen sie zentriert auf der Fußplatte des Photomikroskops. Auf dem Objektisch wird

eine Niedervolt-Mikroskopierlampe und ihr gegenüber ein Hohlspiegel montiert, mit dem das Licht unter einem Einfallswinkel von $\sim 30^\circ$ auf das Präparat gerichtet wird. Am Rand des Objektisches wird eine Kreisteilung angebracht; der kleinste exakt ausführbare Drehwinkel beträgt 3° . Bei dieser Anordnung wird das Präparat nicht gedreht.

Versuche

1. Einfluß von Objektivapertur und Einfallswinkel auf die Trennschärfe. Der Helligkeitsbereich $\Delta\psi$ eines einzelnen, in Luft eingeschlossenen Glasfadens wird für 4 Objektive (n. A.: 0,08, 0,16, 0,32 bzw. 0,63) jeweils bei

verschiedenen Einfallswinkeln (α_k : $20, 30, 40, 50$ und 60°) gemessen. Beleuchtung mit parallelem Licht (Anordnung I) zunächst unter senkrechtem Azimut. Der auf dunklem Grund hell leuchtende Glasfaden wird dann mit dem Drehtisch solange in einer Richtung gedreht, bis das Auslöschphänomen eintritt; das Grenzaзимut wird notiert. Dann wird in entgegengesetzter Richtung gedreht, bis das Auslöschphänomen auf der anderen Seite der Ausgangsstellung eintritt. Die Differenz der beiden Grenzaзимute ist der Helligkeitsbereich. Der endgültige Wert für $\Delta\psi$ wird aus 5 Einzelmessungen ermittelt; zu diesem Mittelwert wird nach Gl. (7) aus einer Sinustafel die Trennschärfe abgelesen und in Abb. 4 eingetragen. Die ausgezogenen Kurven stellen die nach Gl. (8) zu erwartenden Trennschärfediagramme der Objektive dar. — Es besteht gute Übereinstimmung zwischen den ex-

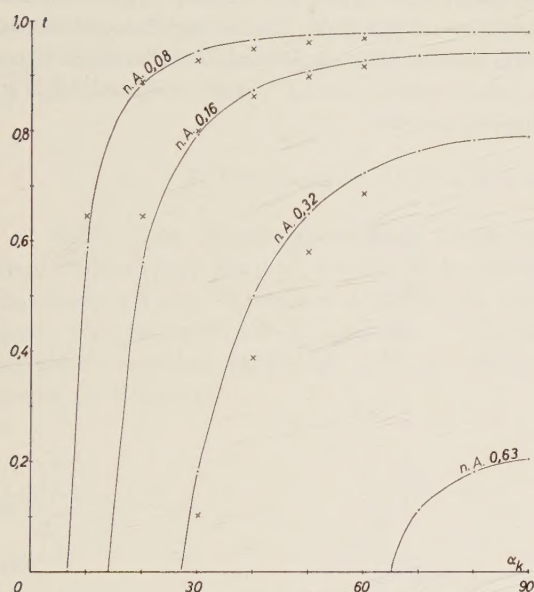


Abb. 4. Trennschärfe t in Abhängigkeit vom Einfallswinkel α_k für Objektive mit verschiedener numerischer Apertur. Die experimentell erhaltenen Werte sind durch $\times$ gekennzeichnet. — Weitgehende Annäherung an $t=1$ für n. A. $\leq 0,16$ und $\alpha_k \geq 60^\circ$.

perimentell gefundenen und den zu erwartenden Werten. (Die auf den Objektiven angegebenen numerischen Aperturen sind garantierte Mindestwerte, die in der Regel von den tatsächlichen Werten etwas übertroffen werden; dies hat zur Folge, daß man nach Gl. (8) für die meisten Objektive eine etwas größere photometrische Trennschärfe erwartet, als praktisch mit ihnen erreicht werden kann.)

Aus den Trennschärfediagrammen (Abb. 4) wird die praktische Bedeutung der numerischen Apertur für die Winkelauflösung einer photometrischen Meßanordnung deutlich: Mit n. A. 0,32 würde selbst bei größtmöglichem Einfallswinkel

($\alpha_k = 90^\circ$) nur eine geringe Winkelauflösung erreicht; Strukturen, deren Schnittwinkel kleiner als 40° ist, könnten mit diesem Objektiv keinesfalls mehr getrennt registriert werden. Dagegen wäre bei $\alpha_k = 90^\circ$ mit n. A. 0,16 schon eine Trennschärfe von 0,943 zu erreichen; das entspräche einem auflösbaren Schnittwinkel von $18,5^\circ$. Für n. A. 0,08 würde die Trennschärfe bei senkrechtem Einfallswinkel 0,987 betragen; d. h. Strukturen, die sich unter einem Winkel von 9° kreuzen, könnten noch durch zwei vollständig voneinander getrennte Helligkeitsmaxima angezeigt werden.

Praktisch muß der Einfallswinkel immer kleiner als 90° sein, da bei streifendem Lichteinfall nicht mehr alle Strukturen im Präparat gleichmäßig beleuchtet werden. Überdies kann man bei Verwendung der üblichen dicken Mikroskoptische höchstens unter $\alpha_k \sim 60^\circ$ beleuchten; aus den Trennschärfediagrammen geht jedoch hervor, daß von Objektiven mit sehr kleiner n. A. auch bei diesem Einfallswinkel schon annähernd die maximale Trennschärfe erreicht wird. Sie beträgt beispielsweise $t = 0,933$ für n. A. 0,16 bzw. $t = 0,983$ für n. A. 0,08; bei diesem Einfallswinkel können also mit den genannten Objektiven Schnittwinkel von 21° (statt maximal $18,5^\circ$) bzw. von $10,5^\circ$ (statt maximal 9°) aufgelöst werden.

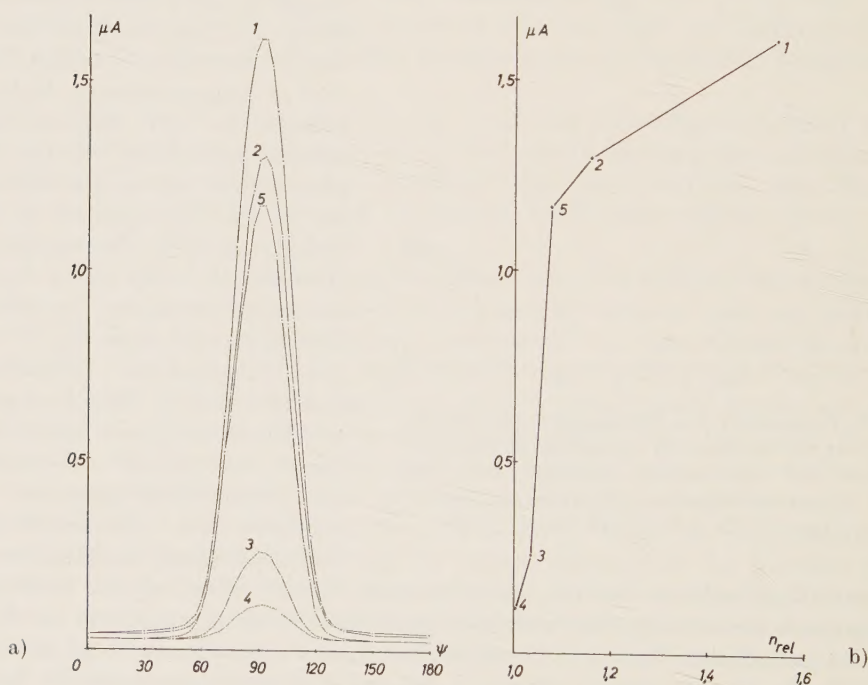


Abb. 5. Einfluß des relativen Brechungsindex (n_{rel}) auf den Azimuteffekt. Einschluß von Glasfäden in: 1) Luft, 2) Wasser, 3) Eukitt, 4) „Gemisch“, 5) α -Bromnaphthalin (vgl. Text). — a) Abszisse: Beleuchtungsazimut (ψ), Ordinate: Galvanometerausschlag in μA . b) Abszisse: relativer Brechungsindex (n_{rel}), Ordinate: Galvanometerausschlag bei senkrechtem Beleuchtungsazimut. Ein ausgeprägter Azimuteffekt wird schon bei $n_{rel} = 1,07$ erreicht.

2. **Einfluß des relativen Brechungsindex.** Bisher wurde noch nicht behandelt, welchen Einfluß auf den Azimuteffekt der relative Brechungsindex ausübt; er ist der Quotient aus den Brechungsindices der Struktur und des Einschlußmediums $n_{\text{rel}} = n_1 : n_2$ (wobei immer $n_1 \geq n_2$, d. h. $n_{\text{rel}} \geq 1$ sein muß). Jeweils 10 parallel ausgerichtete Glasfäden ($n \sim 1,54$) werden in Luft ($n = 1,00$), Wasser ($n = 1,33$), Eukitt ($n = 1,49$), einem Gemisch aus α -Bromnaphthalin und Dibutylphthalat ($n = 1,55$) bzw. in α -Bromnaphthalin ($n = 1,66$) eingeschlossen (vgl. v. HIRSCH, 1952). Die Beleuchtungsanordnung II wird in Stufen von 3° vom Azimut 0° über 90° bis 180° gedreht und jeweils der Galvanometerausgang notiert. — Für die einzelnen Präparate ergeben sich Helligkeitsdiagramme, deren Amplitudenhöhe mit dem relativen Brechungsindex wächst (Abb. 5 a). Bei $n_{\text{rel}} \sim 1$ (Einschluß in das Gemisch) tritt ein kaum meßbarer Azimuteffekt auf; der Glasfaden bleibt auch bei senkrechtem Beleuchtungsazimut dunkel. Man erhält jedoch einen stark ausgeprägten Azimuteffekt mit deutlichem Helligkeitsmaximum von $n_{\text{rel}} = 1,07$ (Einschluß in α -Bromnaphthalin) an aufwärts (Abb. 5 b).

3. Photometrische Winkelmessungen

a. *Willkürliche Richtungsverteilung.* Glasfadenbruchstücke werden willkürlich auf einen Objektträger gestreut, so daß sie in statistischer Richtungsverteilung vorliegen. Einschluß in Luft; Objektiv n. A. 0,04; die Beleuchtungsanordnung II (gebündeltes Licht) wird in Stufen um 30° gedreht. — Die für sämtliche Azimute nahezu konstanten photometrischen Meßwerte (Abb. 6) entsprechen der statistischen Richtungsverteilung im Präparat.

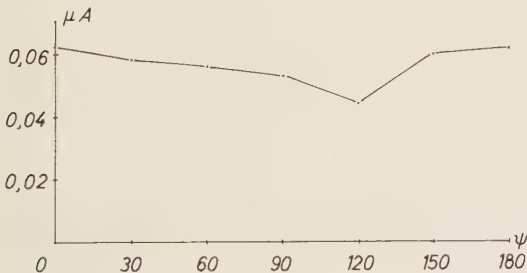


Abb. 6. Photometrische Winkelmessung an Glasfäden mit statistischer Richtungsverteilung. Beleuchtung mit Anordnung II (gebündeltes Licht, Einfallswinkel $\alpha_k \sim 30^\circ$), Objektiv n. A. 0,04. — Annähernd gleiche Helligkeit in allen Azimuten.

b. *Geordnete Richtungsverteilung (Beleuchtung mit gebündeltem Licht).* Gruppen von je 5 parallelen Glasfäden kreuzen sich unter Winkeln von 45° , 30° bzw. 15° . Einschluß in Luft; Objektiv n. A. 0,04; Einfallswinkel $\sim 30^\circ$, Drehung der Beleuchtungsanordnung in Stufen um 3° . — Für das erste Präparat werden in Abständen von 45° drei gleich große Helligkeitsmaxima registriert, zwischen denen die Meßwerte jedesmal wieder fast bis zu den Ausgangswerten zurückkehren (Abb. 7 a). — Beim zweiten Präparat, dessen Glasfaden-Gruppen sich unter Winkeln von 30° kreuzen, überdecken sich die Helligkeitsbereiche beträchtlich; man kann aus dem Diagramm Abb. 7 b nicht sicher erkennen, ob wirklich alle oder nur die Mehrzahl der Fäden in den Richtungen

der vier Gruppen verlaufen. Eine eindeutige quantitative Aussage über die Richtungsverteilung der Glasfäden ist hier mittels der photometrischen Messung nicht mehr ohne weiteres möglich. — Winkel von 15° im dritten Präparat werden unter diesen Beleuchtungsbedingungen überhaupt nicht mehr als getrennte Verlaufsrichtungen registriert (Abb. 7 c).

c. *Geordnete Richtungsverteilung (Beleuchtung mit parallelem Licht).* Zwei Gruppen von je 5 parallelen Glasfäden (Abb. 8) kreuzen sich unter einem Winkel von 30 bzw. 25, 20, 15, 10 und 5° . Einschluß in Luft; Objektiv n. A. 0,04; Beleuchtung unter größtmöglichem Einfallswinkel ($\alpha_k \sim 60^\circ$). Innerhalb des Helligkeitsbereiches wird das Objekt in Stufen von 1 bzw. $0,5^\circ$ gedreht. — Glasfäden, die sich unter Winkeln von $\geq 15^\circ$ schneiden, werden praktisch vollständig getrennt registriert (Abb. 9 a–d). Auch Kreuzungswinkel von 10° werden noch einwandfrei erfaßt (Abb. 9 e). Selbst Glasfäden, die sich unter einem Winkel von 5° schneiden, werden von dieser Versuchsanordnung noch durch zwei deutlich unterscheidbare Helligkeitsmaxima angezeigt (Abb. 9 f).

Nach Gl. (8) ist für die Anordnung in Versuch 3 c eine Trennschärfe von 0,996 zu erwarten, d. h. Schnittwinkel bis herunter zu 5° müßten vollständig aufgelöst werden. Praktisch wird diese Trennschärfe nicht ganz erreicht. Dies liegt in erster Linie an der Beleuchtungsanordnung, deren Licht wie oben beschrieben nur annähernd parallel gemacht werden kann; nach $t = \cos(\Delta\psi + \epsilon)$ ist die Trennschärfe um den ver-

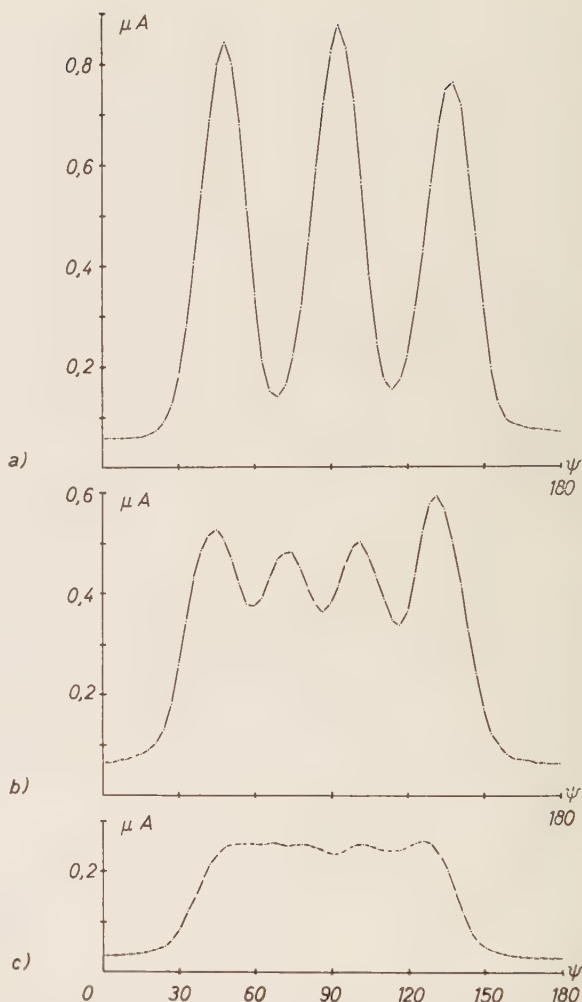


Abb. 7. Photometrische Winkelmessung an gekreuzten Glasfäden. Meßanordnung s. Abb. 6. — a) Kreuzungswinkel 45° : sehr gute Trennung der Helligkeitsbereiche. b) Kreuzungswinkel 30° : Überschneidung der Helligkeitsbereiche; die Maxima sind noch erkennbar. c) Kreuzungswinkel 15° : Keine Trennung der Helligkeitsbereiche; eine Aussage über die Verlaufsrichtungen der Glasfäden ist nicht möglich.

bleibenden Konvergenzwinkel vermindert. Außerdem liegt die n. A. des verwendeten Objektivs sicher etwas über 0,04 (vgl. S. 133). Der Versuch zeigt jedoch eindrucksvoll, daß schon mit einer improvisierten Anordnung ein hohes Winkelauflösungsvermögen

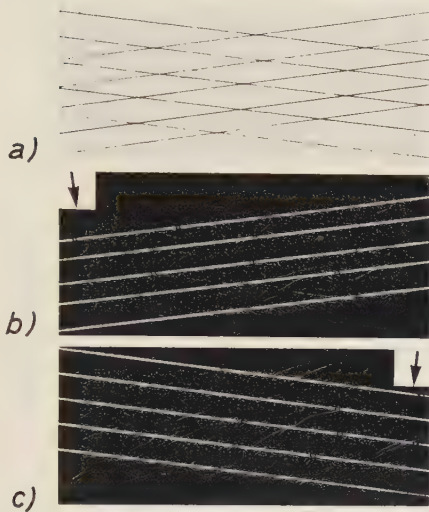


Abb. 8. Modellpräparat aus Glasfäden, die sich unter 15° kreuzen. a) Hellfeldbeleuchtung. b) u. c) Einseitige Dunkelfeldbeleuchtung in Pfeilrichtung mit Anordnung I (paralleles Licht, Einfallswinkel $\alpha_k \sim 60^\circ$); Objektiv n. A. 0,04.

erreicht werden kann. Auf Möglichkeiten zur Verbesserung der Meßanordnung wird noch eingegangen (vgl. S. 139).

C. Anwendung der Methode

An Präparaten von menschlichem Myometrium (vgl. 1. Mitt., S. 112) wird die Verteilung der Verlaufsrichtungen von Muskelbündeln photometrisch bestimmt. Hierbei werden die oben untersuchten Beziehungen zwischen dem Helligkeitsbereich und den optischen Parametern der Versuchsanordnung nach Möglichkeit beachtet: Durch die besondere Art der Vorbehandlung unserer Schnitte (Einschluß in Kariongelatine, $n = 1,45$, ohne vorausgehende Entwässerung, s. 2. Mitt.) ist ein relativer Brechungsindex von 1,07 annähernd gewahrt. Wir verwenden das Objektiv mit der schwächsten n. A. (0,04). Um ausreichende Helligkeit zu erzielen, müssen wir mit Anordnung II (gebündeltes Licht, Einfallswinkel $\sim 30^\circ$) beleuchten; nach dem Ergebnis von Versuch 3 b (Abb. 7 a) können auf diese Weise Schnittwinkel von 45° annähernd vollständig aufgelöst werden. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der unmittelbaren Winkelmessung (1. Mitt.) herangezogen.

In Abb. 10 a – c sind in Richtung der Ordinate sowohl die Trefferhäufigkeit der unmittelbaren Winkelmessung als auch die Galvanometerwerte der photometrischen Methode aufgetragen. – In allen drei Beispielen besteht gute Übereinstimmung zwischen den mit beiden Methoden erhaltenen Diagrammen. Dabei ist nicht die absolute Höhe der aus den unmittelbaren bzw. aus den photometrischen Winkelmessungen stammenden Werte entscheidend – sie hängt vom willkürlich gewählten Ordinatenmaßstab ab –,

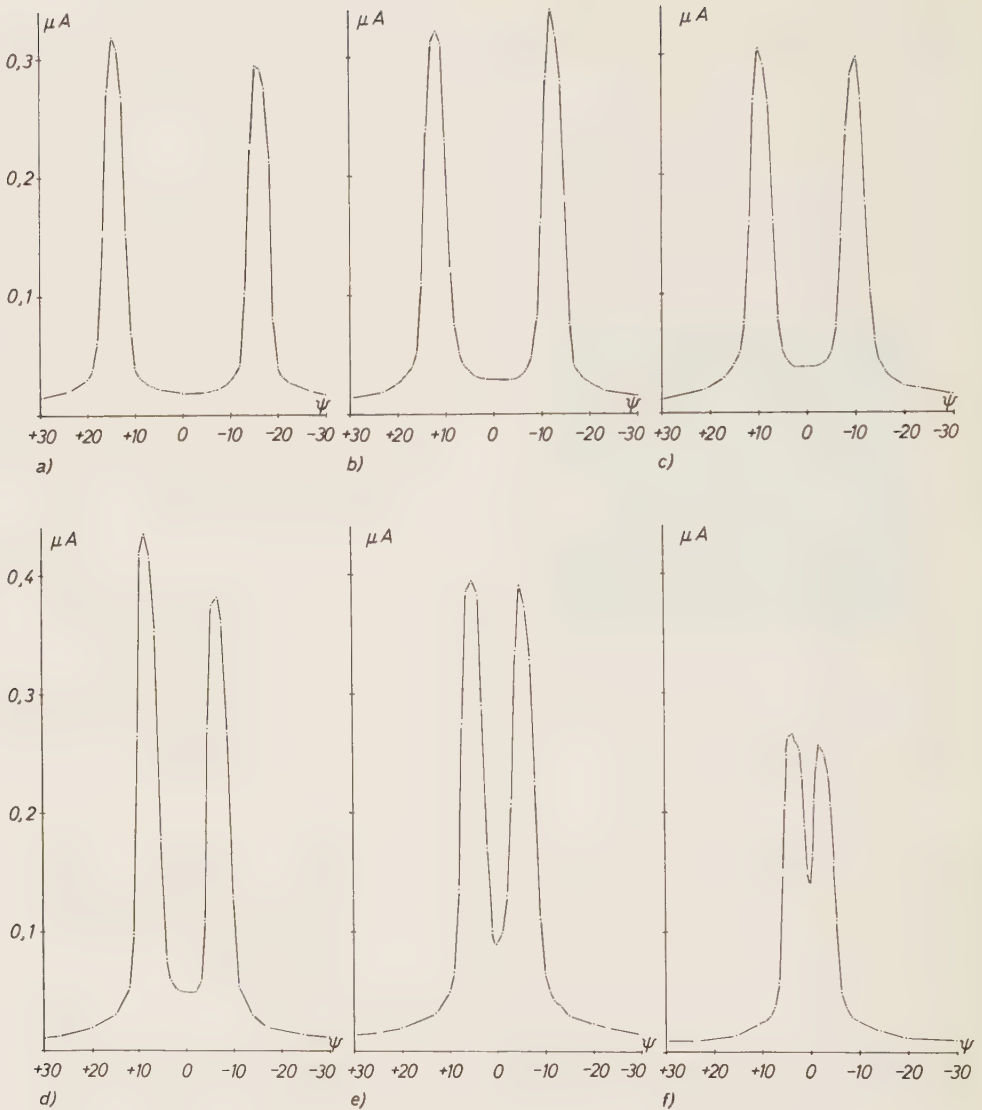


Abb. 9. Photometrische Winkelmessung an gekreuzten Glasfäden. Meßanordnung s. Abb. 8. Kreuzungswinkel: a) 30° , b) 25° , c) 20° , d) 15° , e) 10° , f) 5° . — Bis herunter zu 15° vollständige, bei 10° noch gute Trennung der Helligkeitsbereiche. Sogar bei 5° sind die Maxima noch deutlich gegeneinander abgegrenzt.

sondern die Übereinstimmung im gesamten Kurvenverlauf, also die Höhe der Amplituden und die Lage der Maxima und Minima innerhalb derselben Winkelklassen.

Zu berücksichtigen ist, daß die Helligkeit im Gesichtsfeld nie auf Null absinken kann. Durch andere Gewebbestandteile wie z. B. Bindegewebe und Gefäße, an denen unser Material reich ist, erfolgt immer auch eine zusätzliche Aufhellung des Gesichtsfelds.

feldes („Grundhelligkeit“); solange diese Bestandteile gleichmäßig in allen Richtungen verlaufen, wird die photometrische Messung der Richtungsverteilung linearer Strukturen im histologischen Präparat durch die Grundhelligkeit nicht beeinflusst.

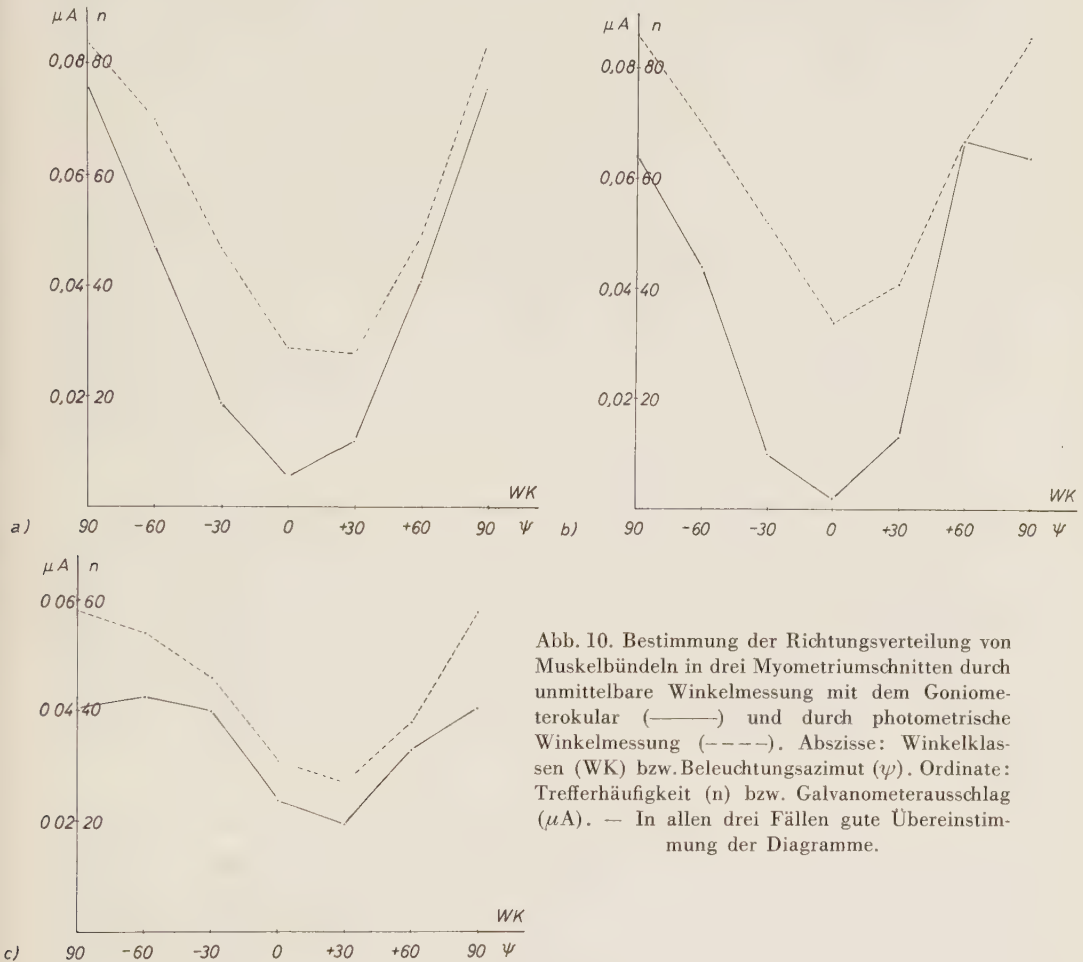


Abb. 10. Bestimmung der Richtungsverteilung von Muskelbündeln in drei Myometriumschnitten durch unmittelbare Winkelmessung mit dem Goniometerokular (—) und durch photometrische Winkelmessung (----). Abszisse: Winkelklassen (WK) bzw. Beleuchtungsazimut (ψ). Ordinate: Trefferhäufigkeit (n) bzw. Galvanometeraussschlag (μA). — In allen drei Fällen gute Übereinstimmung der Diagramme.

D. Möglichkeiten zur Vervollkommnung und Rationalisierung der Methode

Zur Entwicklung der Methode wurden optische Geräte verwandt, die in der Regel in histologischen Laboratorien vorhanden sind (Mikroskop bzw. Photomikroskop, Mikroskopierleuchten, Selen-Photozelle mit Galvanometer, Projektor). Die beschriebenen Beleuchtungs- und Meßanordnungen können daher verhältnismäßig leicht und ohne größeren Aufwand hergestellt und besonderen Verhältnissen angepaßt werden. Sie haben ihren Zweck bei der Analyse der methodischen Grundlage des Verfahrens vollauf erfüllt.

Abschließend soll umrissen werden, in welcher Weise die Methode apparativ zu vervollständigen ist, wenn ausgedehnte systematische Vergleichsuntersuchungen eine maximale Präzision der Meßbedingungen erfordern und möglichst rationell durchgeführt werden sollen. Diese Überlegungen sind um so berechtigter, als das Prinzip, die quantitative Richtungsverteilung linearer Strukturen mit Hilfe des Azimuteffektes photometrisch zu messen, über biologisch-morphologische Fragestellungen hinaus noch weitere Anwendung finden kann, so z. B. für die Strukturanalyse bestimmter Werkstoffe, Textilmaterialien u. dgl.

1. Anzustreben ist eine Beleuchtung mit parallelem Licht, die außerdem eine hohe Lichtintensität besitzt; auch bei Objektiven mit kleiner n. A. sollte unter größtmöglichem Einfallswinkel beleuchtet werden können, z. B. durch Verwendung eines möglichst dünnen Objektisches (vgl. S. 134). Ein Nachteil der einseitigen Dunkelfeldbeleuchtung ist die ungleichmäßige Ausleuchtung des Präparates; die der Lichtquelle zugewandte Seite ist etwas heller als die abgewandte. Dies kann durch eine „zweiseitige“ Dunkelfeldbeleuchtung kompensiert werden, bei der aus einander gegenüberliegenden Azimuten beleuchtet wird.

2. Der drehbare Teil der Anordnung (Beleuchtung bzw. Objektisch) muß gegenüber dem fixen Teil exakt zentrierbar sein, da sonst Meßfehler in bestimmten Azimutbereichen auftreten.

3. Eine optimale Rationalisierung der Methode wird erreicht, wenn eine fortlaufend registrierende Photometereinrichtung (Direktschreiber) mit dem drehbaren Teil der Anordnung gekoppelt ist. Die Anordnung könnte aus Einzelteilen zusammengestellt oder — sofern der Herstellungsaufwand gerechtfertigt ist — als selbständiges Meßgerät gefertigt werden; dieses Gerät wäre als „Winkelphotometer“ zu bezeichnen. Die unmittelbare, fortlaufende Registrierung der quantitativen Richtungsverteilung linearer Elemente in Form von Photometer-Diagrammen würde nur sehr geringe Zeit beanspruchen und bereits dokumentierte Ergebnisse liefern.

Zusammenfassung

Bei geeignetem Verhältnis der Brechungsindices im mikroskopischen Präparat ($n_{\text{rel}} \geq 1,07$) tritt im einseitigen Dunkelfeld an linearen Strukturen ein deutlicher Azimuteffekt auf, der zur quantitativen photometrischen Bestimmung ihrer Richtungsverteilung herangezogen wird. Die Abhängigkeit des Helligkeitsbereiches (I_{ψ}) von Einfallswinkel (α_k) und Bündelung des Lichtes und von der num. Apertur des Objektivs ($\sin \alpha_0$) wird aus dem Strahlengang abgeleitet und in Modellversuchen an Glasfadenpräparaten bestätigt. Die Winkelauflösung (Trennschärfe t) wird durch den Cosinus des kleinsten Schnittwinkels gekreuzter Strukturen ausgedrückt, deren Helligkeitsbereiche gerade noch ohne Überschneidung angezeigt werden. Bei Beleuchtung mit parallelem Licht ist

$$t = \cos \Delta\psi = 1 - 2 \frac{\sin^2 \alpha_0}{\sin^2 \alpha_k}.$$

Eine gute Trennschärfe wird mit annähernd parallelem Licht erreicht, wenn $\sin \alpha_0 < 0,16$ und $\alpha_k \geq 60^\circ$ ist; so können mit einer aus einfachen Geräten zusammengestellten Versuchsanordnung bei $\alpha_k = 60^\circ$ mit Objektiv n. A. 0,04 Schnittwinkel von 15° einwandfrei aufgelöst werden.

Als Beispiel für die Anwendung der Methode wird die Richtungsverteilung glatter Muskelbündel in Präparaten von menschlichem Myometrium photometrisch ermittelt; die Ergebnisse stimmen mit denen der unmittelbaren Winkelmessung (1. Mitt.) gut überein. Zur rationellen Anwendung der Methode wird ein „Winkelphotometer“ vorgeschlagen, das mit exakt zentrierbarer Dreheinrichtung und „zweiseitiger“ Dunkelfeldbeleuchtung mit streng parallelem Licht ausgestattet ist.

Summary

With a suitable relation of the refractive indices of the preparation ($n_{\text{rel}} \geq 1.07$) a noticeable azimuth effect occurs with linear structures in unilateral darkfield; this can be used for the photometric determination of the distribution of their directions. The dependence of the range brightness ($\Delta\psi$) on the angle of incidence (α_k) and the focusing of the light and on the numerical aperture of the objective ($\sin \alpha_0$) is deduced from the nature of the optical path and has been confirmed by model experiments with glass thread preparations. The angular resolution (resolving power t) is expressed by the cosine of the smallest angle of intersection of different structures whose ranges of brightness are still shown without overlapping. If parallel light is used for the illumination,

$$t = \cos \Delta\psi = 1 - 2 \frac{\sin^2 \alpha_0}{\sin^2 \alpha_k}.$$

Good resolution is achieved with almost parallel light if $\sin \alpha_0 < 0.16$ and $\alpha_k \geq 60^\circ$; thus, using a simple device at $\alpha_k = 60^\circ$ angles of intersection of 15° can be resolved without difficulty with an objective of n. A. 0.04.

As an example for the use of this method the direction distribution of smooth muscle bundles in the wall of the human uterus was photometrically determined; the results are in good agreement with those of the direct angle measurement (1st communication). — For the efficient use of the method an “angle photometer” is suggested, which has a rotating device that can be accurately centred, and “bilateral” darkfield illumination with strictly parallel light.

Résumé

À relation appropriée des indices de réfraction ($n_{\text{rel}} \geq 1,07$) dans la préparation microscopique, au fond noir unilatéral on obtient un très net effet uniaximuthal aux structures linéaires; par photométrie il est utilisé pour déterminer quantitativement leurs distributions dans les différentes directions. La relation entre la domaine de brillance ($\Delta\psi$) et l'angle d'incidence (α_k), le faisceau lumineux et l'ouverture numérique de l'objectif ($\sin \alpha_0$) est déduite du trajet lumineux et se confirme dans les expériences-modèles faits à l'aide des fils en verre. La définition angulaire (pouvoir séparateur t) est exprimé par le cosinus de l'angle minimal d'intersection des structures croisées dont le domaine de brillance reste encore sans chevauchement. En éclairage en lumière parallèle, il est

$$t = \cos \Delta\psi = 1 - 2 \frac{\sin^2 \alpha_0}{\sin^2 \alpha_k}.$$

Un bon pouvoir séparateur est atteint en lumière quasi-parallèle, lorsque $\sin \alpha_0 < 0,16$ et $\alpha_k \geq 60^\circ$, de sorte qu'à $\alpha_k = 60^\circ$, avec un simple arrangement instrumental, un angle d'intersection de 15° peut être parfaitement défini avec un objectif o. n. 0,04.

L'exemple pris pour l'application de cette méthode est la détermination de l'anisotropie du faisceau musculaire lisse dans les préparations de musculature utérine humaine; les résultats obtenus concordent bien avec ceux de la mesure angulaire directe (1^{er} rapport). En vue d'une utilisation rationnelle de cette méthode, il nous est proposé un „photomètre angulaire“, équipé d'un dispositif de rotation à centrage précis et un éclairage en fond noir „bilatéral“ à lumière strictement parallèle.

Literatur

- HIRSCH, TH. VON: Histologische Schnitte im Phasenkontrastbild. *Z. wiss. Mikrosk.* 61, 68—70 (1952).
- PFOCH, M., H. WAGNER und R. WETZSTEIN: Methoden zur Richtungsbestimmung linearer Strukturen in der Histologie. 1. Mitt.: Quantitative Bestimmung durch unmittelbare Winkelmessung. *Z. wiss. Mikrosk.* 69, 108—115 (1968).
- SIEDENTOPF, H.: Über ultramikroskopische Abbildung linearer Objekte. *Z. wiss. Mikrosk.* 29, 1—47 (1912).
- WAGNER, H.: Methoden zur Richtungsbestimmung linearer Strukturen in der Histologie. 2. Mitt.: Beobachtung im einseitigen Dunkelfeld (Azimuteffekt). *Z. wiss. Mikrosk.* 69, 116—122 (1968).

[Eingegangen am 4. Juni 1968]

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. Manfred Pfoch, Anatomisches Institut der Universität, 23 Kiel, Neue Universität.

Herrn Prof. Dr. med. R. Bachmann, Direktor des Instituts für Histologie und experimentelle Biologie, danke ich für die entgegenkommende Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Erlaubnis zur Benutzung der Einrichtungen und Hilfsmittel des Instituts.

Herrn Prof. Dr. med. R. Wetzstein gilt mein Dank für die Einführung in die der Arbeit zugrunde liegende Problemstellung sowie für zahlreiche Ratschläge, kritische Hinweise und Diskussionen, durch die er meine Arbeit stets gefördert hat.

Des weiteren danke ich Herrn Priv.-Dozenten Dr. med. H. Wagner für wertvolle Diskussionen sowie Frau H. Asam für die mit großer Sorgfalt ausgeführten photographischen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 14. 8. 1938 wurde ich als ältestes von drei Kindern der Eheleute Bruno und Lieselotte Pfoch, geb. Kimmich, in Essen geboren. Mein Vater ist kaufmännischer Angestellter. —

Von 1945—49 besuchte ich die Grundschule, anschließend bis 1959 das mathematisch-naturwissenschaftliche Helmholtz-Gymnasium in Essen. Nach dem Abitur wurde ich zur Ableistung des Grundwehrdienstes einberufen.

Das Studium der Medizin begann ich im WS 1960/61 an der Universität München; hier legte ich nach dem WS 1962/63 das Physikum ab. Im 7. Semester studierte ich an der Universität Kiel. Nach meiner Rückkehr an die Universität München begann ich im Sommersemester 1964 neben dem klinischen Studium am Institut für Histologie und experimentelle Biologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Wetzstein die Arbeit an meiner Dissertation. Das medizinische Staatsexamen schloß ich am 21. 7. 1966 mit „sehr gut“ ab.

Im Anschluß an das Examen arbeitete ich bis Dezember 1966 am Institut für Histologie und experimentelle Biologie als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle. Von Januar bis März 1967 war ich Medizinalassistent an der Kinder-Poliklinik der Universität München. Seit April 1967 arbeite ich als Medizinalassistent auf der chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Baumholder.

Am 30. 5. 1963 heiratete ich die Medizinstudentin Fräulein Eva Giritsch; unser Sohn Thomas wurde am 12. 2. 1964 geboren.

Manfred Pfoch

